

龈下菌斑诱导的耐受对人巨噬细胞分泌 TNF- α 和 IL-10 的影响及机制

卢伟, 贡丹军, 孙梦君, 徐艳, 孙颖*

(南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室, 南京医科大学附属口腔医院牙周科, 江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**观察龈下菌斑诱导的耐受对人巨噬细胞分泌炎症因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)和抗炎因子白介素-10(interleukin 10, IL-10)的影响, 以及与 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)2、TLR4 的关系。**方法:**采集中、重度慢性牙周炎患者及健康人的龈下菌斑, 分别重复刺激, 诱导人巨噬细胞产生耐受。采用 ELISA 技术检测 TNF- α 和 IL-10 表达水平的变化, 采用流式细胞技术检测 TLR2、TLR4 表达水平的改变。**结果:**2 种菌斑第 1 次刺激巨噬细胞后, TNF- α 和 IL-10 水平均较刺激前明显增高($P < 0.05$)。2 种菌斑重复刺激后, TNF- α 分泌水平均较第 1 次刺激后明显降低($P < 0.05$), IL-10 水平均与第 1 次刺激后无明显差别($P > 0.05$)。尽管 2 种菌斑第 1 次刺激后, TLR2、TLR4 表达水平均较刺激前明显升高($P < 0.05$), 2 种菌斑重复刺激后, TLR2、TLR4 表达水平均与第 1 次刺激后无明显差别($P > 0.05$)。**结论:**龈下菌斑诱导的耐受能够抑制 TNF- α 的分泌, 进而可能影响牙周组织的炎症和免疫反应, 但这种改变与 TLR2、TLR4 表达水平无关。

[关键词] 龈下菌斑; 内毒素耐受; 肿瘤坏死因子- α ; IL-10; Toll 样受体 2; Toll 样受体 4

[中图分类号] R781.41

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)05-722-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20150529

Effects and mechanisms of endotoxin tolerance induced by subgingival plaques on the productions of TNF- α and IL-10 in human macrophages

Lu Wei, Gong Danjun, Sun Mengjun, Xu Yan, Sun Ying*

(Jiangsu Key Laboratory of Oral Diseases, Department of Periodontology, the Affiliated Hospital of Stomatology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of endotoxin tolerance induced by subgingival plaques on the productions of inflammatory cytokine TNF- α and anti-inflammatory cytokine IL-10 and the protein expressions of Toll-like receptor 2, 4 (TLR2, 4) in human macrophages. **Methods:** Macrophages were pretreated with subgingival plaques from moderate to severe chronic periodontitis patients or healthy controls (24h), washed (2h) and treated with the same plaques again (24 h). Levels of TNF- α and IL-10 in supernatant were detected by ELISA. Moreover, TLR2, 4 protein expressions in these cells were explored by flow cytometry. **Results:** The amounts of TNF- α and IL-10 secreted by macrophages stimulated with both kinds of subgingival plaques were increased significantly after 24h ($P < 0.05$). After repeated stimulation with the same plaques, secretions of TNF- α were decreased significantly compared with those following single challenge ($P < 0.05$), while only comparable levels of IL-10 were confirmed in both two kinds of plaques-tolerized cells ($P > 0.05$). However, no significant changes of TLR2 and 4 were detected in macrophages retreated with these plaques compared with those following single stimulations. **Conclusion:** Secretions of TNF- α could be suppressed by endotoxin tolerance induced by subgingival plaques, which might contribute to limiting periodontal inflammation. However, development of this tolerance might not be affected by TLR2 and 4.

[Key words] subgingival plaque; tolerance; TNF- α ; IL-10; Toll-like receptor 2; Toll-like receptor 4

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(05): 722-726]

[基金项目] 国家自然科学基金(81370025); 江苏省高等学校大学生实践创新训练计划(201310312017Z); 江苏高校优势学科建设工程资助(2014-37)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: ebolasun@njmu.edu.cn

牙周炎是一种慢性感染性疾病,包含牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)、中间普氏菌(*Prevotellati intermedia*, *P. intermedia*)、伴放线聚集杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *A. actinomycetemcomitans*)等牙周致病菌的龈下菌斑生物膜是牙周炎的始动因素。在牙周炎漫长的病程中,可能因为先前的细菌或毒力因子刺激而使机体对后续刺激的反应性减弱,产生内毒素耐受^[1]。内毒素耐受包括相同刺激因子重复刺激产生的耐受和不同刺激因子重复刺激产生的交叉耐受^[2]。在本课题组的前期研究中,已就单一毒力因子 *P. gingivalis* 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的耐受和 *P. gingivalis* 全菌诱导的耐受的效应和机制进行了初步探索^[3]。在不同的炎症状态下,龈下菌斑的细菌组成和数量变化较大,其诱导的耐受效应和机制可能更为复杂。

单核/巨噬细胞是牙周炎免疫调节网络中的重要组成部分,对维持机体内稳态平衡具有重要的意义^[4]。机体持续暴露于多种牙周致病菌及其毒性产物环境中,可能会产生内毒素耐受,进而影响牙周炎的发生和发展^[5]。本研究以人单核细胞系 THP-1 细胞诱导生成的巨噬细胞为研究对象,试图构建一种龈下菌斑诱导的耐受模型,初步探讨菌斑诱导的耐受对牙周炎症反应的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

THP-1 细胞(上海生科院细胞所),RPMI 1640 培养液(Gibco 公司,美国),胎牛血清(Hyclone 公司,澳大利亚),佛波酯(PMA, Sigma 公司,美国),肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素-10 (IL-10) ELISA 试剂盒(R&D 公司,英国),FITC-抗人 TLR2 抗体、PE-抗人 TLR4 抗体、FITC IgG2b 和 PE IgG1 (eBioscience 公司,美国),FACS Calibur(BD 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 龈下菌斑的采集

收集 2013 年 4~12 月到南京医科大学附属口腔医院牙周科就诊的中、重度慢性牙周炎患者 18 例,纳入标准:①口腔中每个象限至少存在 2 颗牙齿(第三磨牙除外),探诊深度(probing depth, PD) ≥ 5.0 mm,临床附着丧失(clinical attachment loss, CAL) ≥ 3.0 mm,牙槽骨吸收超过根长的 1/3;②全身健康状况良好,无系统性疾病;③1 年内未接受

过牙周治疗;④半年内未服用抗菌药物或非甾体类抗炎药;⑤半年内未使用免疫抑制剂;⑥无吸烟史。

同时收集健康志愿者 18 例,要求纳入研究的对象:①牙列完整(第三磨牙除外),PD ≤ 3.0 mm, CAL ≤ 1.0 mm,未见明显牙槽骨吸收;②同时满足牙周炎患者的纳入标准②~⑥。

所有纳入研究的对象,去除龈上大块牙石后,采用无菌刮匙刮取龈下菌斑,称重后,悬浮于 PBS 溶液中,调整浓度至 10 mg/mL,95 $^{\circ}$ C 灭活 5 min,-80 $^{\circ}$ C 保存备用^[6]。

1.2.2 人巨噬细胞耐受后, TNF- α 和 IL-10 分泌水平的检测

将传代后 2~3 d 的 THP-1 细胞以 1×10^6 个/mL 密度接种于 6 孔板中,加入 PMA 诱导 48 h 后备用。将诱导生成的人巨噬细胞分成如下 5 组,每组 5 复孔:第 1、2、4 组加入不含菌斑的 RPMI1640 培养液(medium),第 3 组加入预先配制的含 1 μ g/mL 中、重度慢性牙周炎患者龈下菌斑的 RPMI1640 培养液,第 5 组加入含 1 μ g/mL 健康人龈下菌斑的 RPMI1640 培养液。预刺激 24 h 后,弃培养液上清, PBS 洗涤 2 次。第 1 组仍加入不含菌斑的 RPMI 1640 培养液(medium),第 2、3 组加入含 1 μ g/mL 牙周炎患者(CPP)龈下菌斑的 RPMI1640 培养液,第 4、5 组加入含 1 μ g/mL 健康人(HC)龈下菌斑的 RPMI1640 培养液,再次刺激 24 h 后,收集细胞条件培养液,-40 $^{\circ}$ C 储存备用。

将各组细胞条件培养液在常温下溶解,按照 ELISA 试剂盒说明书,各取 50 μ L 条件培养液,分别加入包被了人 TNF- α 和 IL-10 单抗的 ELISA 96 孔板中,采用双抗体夹心法检测 2 种细胞因子的表达水平。

1.2.3 人巨噬细胞耐受后 TLR2、TLR4 蛋白表达水平的流式细胞检测

细胞分组和刺激条件同 1.2.2。再次刺激 24 h 后,将 5 组细胞取出,收集细胞, PBS 洗涤后,以 FITC IgG2a 和 PE IgG2a 作为同型对照,将细胞与 FITC-抗人 TLR2 抗体和 PE-抗人 TLR4 抗体室温共同孵育 30 min,洗去抗体后,1%多聚甲醛固定,采用流式细胞仪检测 TLR2、TLR4 蛋白表达水平。

1.3 统计学方法

采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析,ELISA 检测数据采用单因素方差分析 Dunnett's T3 检验,流式细胞检测数据采用单因素方差分析 LSD 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人巨噬细胞耐受后, TNF-α 和 IL-10 表达水平的变化

中、重度慢性牙周炎患者和健康人的龈下菌斑第 1 次刺激人巨噬细胞后, TNF-α 和 IL-10 表达

水平均较刺激前均明显增高 ($P < 0.05$); 其中, 牙周炎患者的龈下菌斑诱导生成 2 种细胞因子水平均高于健康人 ($P < 0.05$)。2 种菌斑重复刺激后, TNF-α 分泌水平较第 1 次刺激后明显降低 ($P < 0.05$), 但 IL-10 水平与第 1 次刺激后无明显差别 ($P > 0.05$, 图 1)。

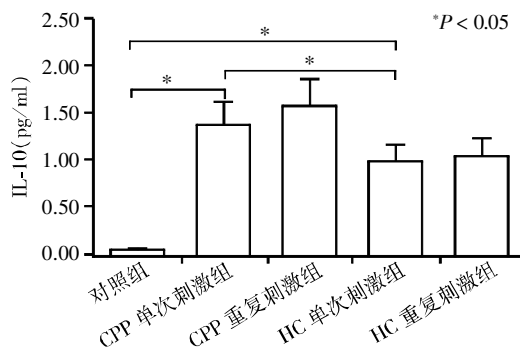
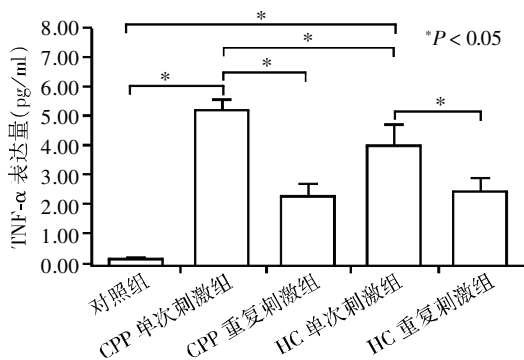


图 1 人巨噬细胞耐受前后 TNF-α 和 IL-10 表达水平的变化

Figure 1 Effects of endotoxin tolerance on the production of TNF-α and IL-10 in human macrophages

2.2 人巨噬细胞耐受后, TLR2、TLR4 表达水平的变化

2 种菌斑第 1 次刺激后, TLR2、TLR4 表达水平均较刺激前明显升高 ($P < 0.05$)。其中, 慢性牙周炎患者的龈下菌斑刺激后, TLR4 表达水平明显

高于健康人 ($P < 0.05$), TLR2 表达水平与健康人无明显差别 ($P > 0.05$)。但是, 2 种菌斑重复刺激后, TLR2、TLR4 表达水平均与第 1 次刺激后无明显差别 ($P > 0.05$, 图 2), 代表性的流式细胞检测结果如图 3 所示。

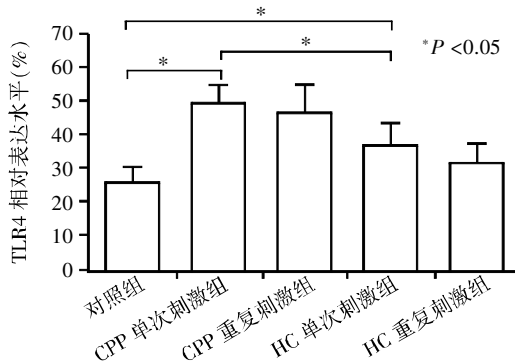
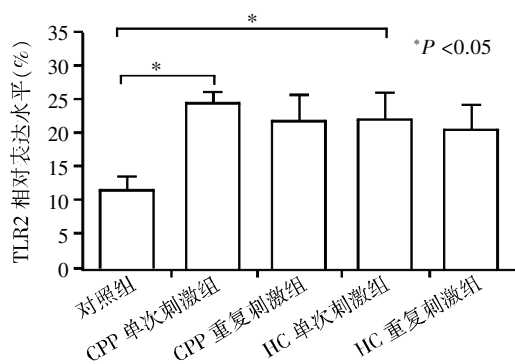


图 2 中、重度慢性牙周炎患者和健康人的龈下菌斑刺激人巨噬细胞耐受后 TLR2、TLR4 表达水平的变化

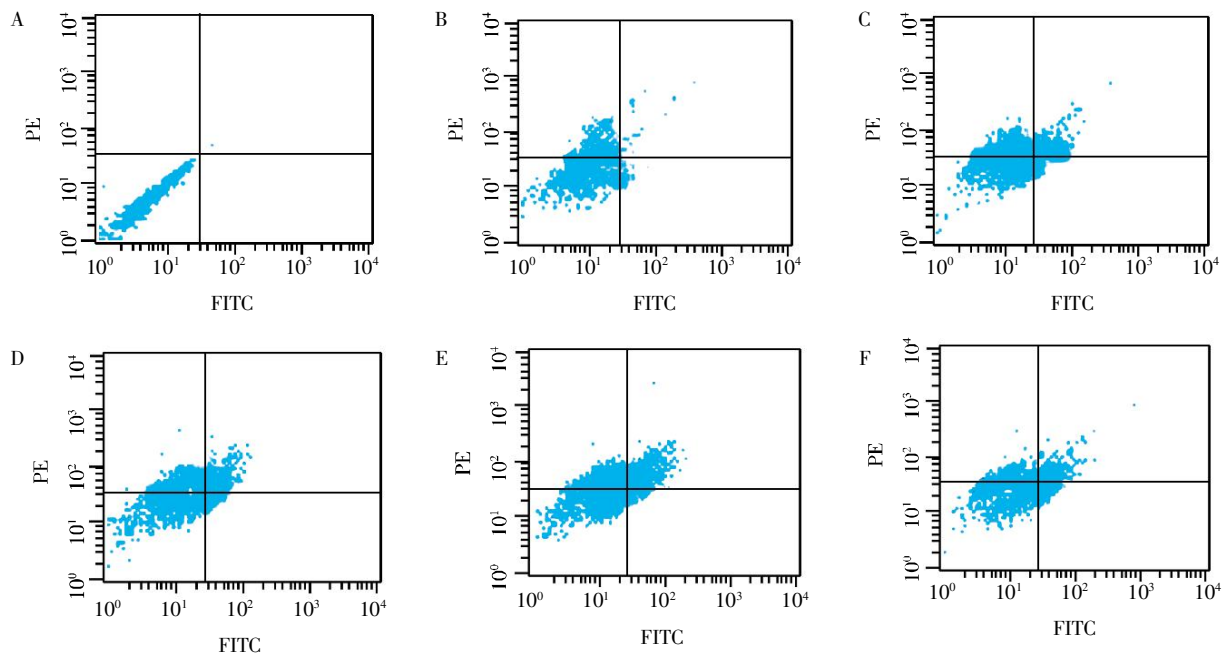
Figure 2 Effects of endotoxin tolerance on the expressions of TLR2, TLR4 in human macrophages

3 讨论

慢性牙周炎是一种感染性疾病, 病原微生物与局部刺激因素引起的直接损伤和宿主对持续存在的菌斑微生物的免疫应答所引起的间接损伤共同决定了疾病的发生和发展。在本研究中, 2 种龈下菌斑第 1 次刺激后, TNF-α 和 IL-10 分泌水平均明显增高。其中, 慢性牙周炎患者的龈下菌斑诱导产生的 TNF-α 和 IL-10 水平明显高于健康人, 推测可能与 2 种菌斑的微生物组成及数量不同有关。研究证实, 中、重度慢性牙周炎患者的优势菌为 *P. gin-*

givalis 为代表的 G-厌氧菌及螺旋体, 其数量较健康人明显增多^[7]。

TNF-α 是一种重要的炎症因子, 主要由巨噬细胞、中性粒细胞等细胞产生, 能增强破骨细胞活性, 诱导基质金属蛋白酶和前列腺素 E₂ 的产生。Brudecki 等^[8] 的研究发现, 人单核细胞受到炎症刺激时, TNF-α 分泌水平增高, 这与本研究相符。IL-10 是一种抗炎因子, 可抑制免疫细胞产生包括 TNF-α 在内的多种细胞因子, 在复杂的细胞因子网络中, 发挥平衡免疫应答的作用, 对减轻免疫损伤有重要作用^[9]。



A: 同型对照; B: 第 1 组空白对照组 (medium-medium); C: 第 2 组慢性牙周炎患者的龈下菌斑单次刺激组 (medium-CPP); D: 第 3 组龈下菌斑重复刺激组 (CPP-CPP); E: 第 4 组 HC 龈下菌斑单次刺激组 (medium-HC); F: 第 5 组 HC 龈下菌斑重复刺激组 (HC-HC)。

图 3 中、重度慢性牙周炎患者和健康人龈下菌斑刺激前后人巨噬细胞 TLR2、TLR4 蛋白表达水平的流式细胞检测

Figure 3 Expression of TLR2 and TLR4 protein in human macrophages with or without subgingival plaques treatment detected by flow cytometry

长期的牙周炎症过程中存在耐受现象^[1]。Foey 等^[10]的研究证实, *P. gingivalis* 诱导的耐受单核细胞分泌 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的能力降低。在本研究中,慢性牙周炎患者和健康人的龈下菌斑重复刺激后,诱导产生的耐受巨噬细胞分泌 TNF- α 的能力均较单次刺激时降低,但 IL-10 分泌水平没有明显变化。已有研究证实,内毒素耐受并非细胞因子表达水平的全面下调,而是多种蛋白表达的“程序重排”^[11]。TNF- α 表达水平的降低被认为是判断内毒素耐受的“金标准”^[12]。因此,本研究以 2 种龈下菌斑为刺激物,构建的耐受模型是成功的,无论是慢性牙周炎患者的龈下菌斑还是健康人的龈下菌斑均具有诱导细胞耐受的能力。这种能力有助于机体控制炎症反应的程度,维持机体的内稳态平衡,但也不可能不利于机体有效清除入侵细菌。

Toll 样受体 (toll like receptors, TLRs) 是一种表达于哺乳动物和人体的跨膜蛋白,可以识别微生物的保守结构。目前,已发现 11 种不同的人 TLRs,不同的 TLRs 与不同的配体识别有关。其中,TLR2 能识别肽聚糖、脂蛋白等毒力因子,TLR4 能识别绝大多数 G-菌的脂多糖,与牙周炎的关系非常密切^[13-14]。TLR2、TLR4 识别毒力因子后,可以启动胞内信号转导途径,通过髓样分化因子 88 依赖和非依赖的信号途

径传递信号,引起各种炎症因子、趋化因子和淋巴细胞相关因子的基因表达,启动炎症反应,同时表达协同刺激分子,进一步启动特异性免疫反应^[15]。有文献报道,内毒素耐受过后,TLR4 表达水平下降^[16]。本课题组的前期研究也证实,TLR2、TLR4 表达水平的下降与 *P. gingivalis* LPS 诱导的单核细胞耐受有关^[3]。但是也有研究报道,诱导外周血单核细胞耐受后,没有发现 TLR4 表达水平的降低^[17],推测耐受的发生可能与 TLRs 酪氨酸磷酸化抑制相关,也可能涉及 TLRs 信号通路中的多种受体、转接分子和转录因子的改变,如 TLR2、TLR4 信号通路下游的 IL-1 受体相关激酶 (interleukin-1 receptor-associated kinase, IRAK)1、IRAK4,的降解;丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 和核转录因子 (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 的活化受损等^[8]。Sato 等^[18]的研究发现,TLR2 的特异性配体,巨噬细胞活化脂肽-2 可通过影响 LPS 胞内信号途径,诱导内毒素耐受,而不是通过下调 TLR4 表达。他认为可能存在与内毒素耐受相关的 TLR2、TLR4 非依赖途径。

本研究采用的龈下混合菌斑含有多种细菌,毒力因子众多,诱导的免疫炎症反应更加复杂,其反应可能更类似交叉耐受。Marina 等^[19]采用 *P.gingi-*

valis LPS 和 *E.coli* LPS 交叉重复刺激小鼠腹腔巨噬细胞后发现,在 TNF- α 分泌水平上,*P.gingivalis* LPS 预刺激后,细胞对 *E.coli* LPS 产生的耐受明显弱于 *E.coli* LPS 重复刺激,而 *E.coli* LPS 不能诱导细胞对 *P.gingivalis* LPS 产生耐受。同时,交叉耐受对 NF- κ B 信号转导通路中多种信号分子的抑制作用均明显弱于相应的同种 LPS 重复刺激。

本研究结果提示,中、重度慢性牙周炎患者和健康人的龈下菌斑均能诱导人巨噬细胞产生耐受,导致 TNF- α 分泌水平的降低,这种耐受与 TLR2、TLR4 表达水平无关,其分子机制还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Park SH, Park-Min KH, Chen J, et al. Tumor necrosis factor induces GSK3 kinase-mediated cross-tolerance to endotoxin in macrophages[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(7):607-615
- [2] Nahid MA, Satoh M, Chan EK. MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance[J]. *Cell Mol Immunol*, 2011, 8(4):388-403
- [3] Sun Y, Li H, Sun MJ, et al. Endotoxin tolerance induced by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*; alternations in Toll-Like receptor 2 and 4 signaling pathway[J]. *Inflammation*, 2014, 37(1):268-276
- [4] Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions[J]. *Immunity*, 2010, 32(5):593-604
- [5] Shin J, Kho SA, Choi YS, et al. Antibody and T cell responses to fusobacterium nucleatum and treponema denticola in health and chronic periodontitis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e53703
- [6] Yamaguchi R, Yoshimura A, Yoshioka H, et al. Ability of supragingival plaque to induce toll-like receptor 4-mediated stimulation is associated with cytokine production by peripheral blood mononuclear cells[J]. *J Periodontol*, 2009, 80(3):512-520
- [7] Al-Hebshi NN, Shuga-Aldin HM, Al-Sharabi AK, et al. Subgingival periodontal pathogens associated with chronic periodontitis in Yemenis[J]. *BMC Oral Health*, 2014, 14(1):13
- [8] Brudecki L, Ferguson DA, McCall CE, et al. MicroRNA-146a and RBM4 form a negative feed-forward loop that disrupts cytokine mRNA translation following TLR4 responses in human THP-1 monocytes[J]. *Immunol Cell Biol*, 2013, 91(8):532-540
- [9] Akramas L, Akramienė D, Sakalauskienė J, et al. Effect of (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)- β -glucan on in vitro production of cytokines by leukocytes of patients with periodontitis[J]. *Medicina(Kaunas)*, 2012, 48(4):186-191
- [10] Foey AD, Crean S. Macrophage subset sensitivity to endotoxin tolerisation by *porphyromonas gingivalis*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e67955
- [11] Melo ES, Barbeiro DF, Gorjão R, et al. Gene expression reprogramming protects macrophage from septic-induced cell death[J]. *Mol Immunol*, 2010, 47(16):2587-2593
- [12] Mathison JC, Virca GD, Wolfson E, et al. Adaptation to bacterial lipopolysaccharide controls lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in rabbit macrophages[J]. *J Clin Invest*, 1990, 85(4):1108-1118
- [13] Wara-aswapati N, Chayasadam A, Surarit R, et al. Induction of toll-like receptor expression by *Porphyromonas gingivalis*[J]. *J Periodontol*, 2013, 84(7):1010-1018
- [14] Tateishi F, Hasegawa-Nakamura K, Nakamura T, et al. Detection of fusobacterium nucleatum in chorionic tissues of high-risk pregnant women[J]. *J Clin Periodontol*, 2012, 39(5):417-424
- [15] Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance[J]. *Trends Immunol*, 2009, 30(10):475-487
- [16] Medvedev AE, Lentschat A, Wahl LM, et al. Dysregulation of LPS-induced toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells[J]. *J Immunol*, 2002, 169(9):5209-5216
- [17] Mendes ME, Baggio-Zappia GL, Brunialti MK, et al. Differential expression of toll-like receptor signaling cascades in LPS-tolerant human peripheral blood mononuclear cells[J]. *Immunobiology*, 2011, 216(3):285-295
- [18] Sato S, Nomura F, Kawai T, et al. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor(TLR)2- and TLR4-mediated signaling pathways[J]. *J Immunol*, 2000, 165(12):7096-7101
- [19] Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, Thomas KE, et al. Induction of *in vitro* reprogramming by Toll-like receptor(TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components[J]. *J Immunol*, 2003, 170(1):508-519

[收稿日期] 2015-01-13